

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-56673

(43)公開日 平成8年(1996)3月5日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	8828-4B		
1/21				
9/10				
// (C 1 2 N 1/21		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
		審査請求 未請求 請求項の数9	FD (全 9 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-227302

(22)出願日 平成6年(1994)8月29日

(71)出願人 000004444

日本石油株式会社

東京都港区西新橋1丁目3番12号

(72)発明者 丸橋 健司

神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内

(72)発明者 矢田 哲久

神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内

(72)発明者 渡邊 君子

神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内

(74)代理人 弁理士 藤野 清也 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウロポルフィリノーゲン I I I メチルトランスフェラーゼをコードするDNA 及びこれを用いるビタミンB<sub>12</sub>の生産方法

(57)【要約】

【構成】 プロピオン酸菌由来のウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードするDNA (配列表配列番号1)。この遺伝子をプロピオン酸菌に導入して遺伝子工学的手法によりビタミンB<sub>12</sub>を生産する方法。

【効果】 上記方法によりビタミンB<sub>12</sub>の産生をいちじるしく向上し、工業的に量産することができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードするDNA。

【請求項 2】 プロピオン酸菌由来のウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードするDNA。

【請求項 3】 配列表配列番号 1 記載のウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列をコードするDNA。

【請求項 4】 プロピオン酸菌での発現シグナルのコントロール下に配置されている請求項 1 記載のDNA。

【請求項 5】 プロピオン酸菌で発現することのできるプロモーター、抗生物質耐性遺伝子及びウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードするDNA を含有するプラスミド。

【請求項 6】 プラスミドがプラスミドpNOC 202である請求項 5 記載のプラスミド。

【請求項 7】 請求項 5 または 6 記載のプラスミドでプロピオン酸菌を形質転換して得られるビタミンB<sub>12</sub>産生プロピオン酸菌形質転換体。

【請求項 8】 プロピオン酸菌がプロピオニバクテリウム シャーマニー(*Propionibacterium shermanii*)である請求項 7 記載の形質転換体。

【請求項 9】 請求項 7～8 記載のいずれかの形質転換体を培地中で嫌気条件下に培養し、培養液中にビタミンB<sub>12</sub>を産生せしめ、これを採取することを特徴とするビタミンB<sub>12</sub>の生産方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ビタミンB<sub>12</sub>の生合成に関係するウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードするDNA、これを含有するプラスミド及びこのプラスミドを導入した微生物に関する。さらに本発明は、このウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードするDNA を用い、遺伝子工学的的手法によりビタミンB<sub>12</sub>を工業的に大量に生産する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 ビタミンB<sub>12</sub>は抗悪性貧血剤、末梢神経治療剤、総合ビタミン剤などの医療用途および飼料添加物として重要なビタミンである。工業的な製造法は、ビタミンB<sub>12</sub>の構造の複雑さから全量発酵法で行われている。従来、ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードするDNA 配列は、大腸菌のCysG遺伝子として、またバチルスメガテリウム (*Bacillus megaterium*) [(Journal of Biotechnology, 173 (15) 4893 (1991))、メタノバクテリウム パノビ (*Methanobacterium ivanovii*) (同誌, 173 (15) 4637(1991)) あるいはシュードモナス デニトリフィカンス (*Pseudomonas denitrificans*) (同誌, 172 (10) 5980 (1991)) で

2

単離されている。しかし、ビタミンB<sub>12</sub>の高生産菌であるプロピオニバクテリウム シャーマニー(*Propionibacterium shermanii*)ではそのDNA はまだ単離されておらず、従ってこの遺伝子を用いてビタミンB<sub>12</sub>を大量に増産させようとすることも行なわれていない。

【0003】 このようにビタミンB<sub>12</sub>の高生産菌であるプロピオニバクテリウム シャーマニーのビタミンB<sub>12</sub>生合成遺伝子は、ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含めていまだ単離されておらず、これを用いる遺伝子操作系も確立していない。従って、遺伝子操作によるビタミンB<sub>12</sub>の増産も試みられていない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、このような状況を考慮し、ビタミンB<sub>12</sub>の高生産菌であるプロピオン酸菌から、ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードするDNA (遺伝子)を単離し、これを用いて遺伝子工学的的手法によりビタミンB<sub>12</sub>を大量に生産することを課題としている。

## 20 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、プロピオニバクテリウム シャーマニーにおけるビタミンB<sub>12</sub>生合成の律速段階の酵素がヘム経路より分岐直後のウロポルフィリノーゲンIIIメチルトランスフェラーゼであると考えられることから、当該遺伝子を活性化することによりこの遺伝子を単離し、これを用いて遺伝子工学的的手法によりビタミンB<sub>12</sub>の増産を図ることを鋭意研究した。その結果、プロピオニバクテリウムシャーマニーにおける遺伝子操作系を確立し、ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードするDNA を単離し、当該遺伝子を用いてビタミンB<sub>12</sub>を増産することに成功し、本発明に至った。すなわち、本発明は、ビタミンB<sub>12</sub>高生産菌のプロピオン酸菌からウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子を単離し、この遺伝子をプロピオン酸菌に導入し、当該遺伝子の増幅効果によりウロポルフィリノーゲンIIIメチルトランスフェラーゼを活性化することにより、ビタミンB<sub>12</sub>生産菌のビタミンB<sub>12</sub>を増産する方法である。

【0006】 次に、本発明を詳細に説明する。まず、ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをプロピオン酸菌より単離・精製し、その蛋白のアミノ基末端の配列を決定し、その配列を基にPCR 法(Science, 239, 487 (1988))等により当該酵素遺伝子の一部分を増幅させ、それをプローブとして用いてプロピオン酸菌の染色体ライブラリーから、コロニーハイブリダイゼーション法によりウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子をクローン化する。

【0007】 ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼのプロピオン酸菌からの単離精製は、通常の蛋白の精製単離法によりおこなうことができる。活性

3

の測定は、該酵素がウロポルフィリノーゲンIII をモノメチル化、ジメチル化する酵素であることより、基質であるウロポルフィリノーゲンIII の減少および生成物であるウロポルフィリノーゲンIII のモノ、ジメチル体の生成を高速液体クロマトグラフィーによって測定することにより行なうことができる。

【0008】ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼをコードするDNA 断片のクローニングは、この酵素のアミノ酸配列の情報をもとに通常の方法で行なうことができる。すなわち、プロピオン酸菌の場合には、単離されたウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼのアミノ基末端の配列より、GC含量が約70%と高いのを考慮して〔J. Bacteriol. 109,1047 (1972)〕、何種類かの両向きのプライマーを合成しPCR法その他の方法によってウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子の一部分のDNA 断片を増幅する。次いで、これをプローブとして、ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ全体をコードするDNA 断片を、大腸菌等を用い通常のコロニーハイブリダイゼーション法によりクローニングする。

【0009】次に、プロピオン酸菌におけるベクターは次のようにして創製することができる。ベクターの要件であるプロピオン酸菌中で複製可能なレプリコンとしては、種々のプロピオン酸菌中より抽出される固有のプラスミドを用いることができる。好ましくはプロピオニバクテリウム ペントサセウム(*Propionibacterium pentosaceum*)より抽出されるプラスミドpTY1をあげることができる(図1参照)。また選択マーカーとしては、大腸菌、枯草菌、放線菌などで使われる抗生物質耐性マーカーをプロピオン酸菌でも用いることができる。好ましくは、クロラムフェニコール耐性、カナマイシン耐性、テトラサイクリン耐性等をあげることができる。具体的には、大腸菌、枯草菌、放線菌等に由来する抗生物質耐性遺伝子上流に、プロピオン酸菌中で発現可能ならしめるプロピオン酸菌由来のプロモーターを配置し、該遺伝子を発現させることにより行う。以上の条件を満たすプラスミドであればいずれのものでもプロピオン酸菌用のベクターとして用いることができるが、好ましくはプラスミドpTY10024を例示することができる(図3参照)。得られたプラスミドpTY10024を用いて、ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子をプロピオン酸菌中で発現させるには、プロピオン酸菌由来のプロモーターの支配下にウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子を配置し、プラスミドpTY10024のクローニングサイトに連結してやればよい。このようなプラスミドとして好ましくはプラスミドpNC202を例示することができる(図4参照)。

【0010】プロピオン酸菌の形質転換法は、通常の方法すなわち、コンピテントセル法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法などで行うことができる。

4

【0011】本発明は、ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子を用いて、プロピオン酸菌、特にプロピオニバクテリウム シャーマニーのビタミンB<sub>12</sub>の生産量を向上させる。すなわち、クローニングしたウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子をプロピオン酸菌用のプロモーターで発現できるようにした状態でベクターに連結し、プロピオン酸菌に導入して、ビタミンB<sub>12</sub>の高生産微生物を得る。この微生物の培養は、嫌気条件下、導入した遺伝子の発現に適切な条件で培養することができる。培養物からビタミンB<sub>12</sub>を得るには、通常の方法、例えば、菌体より80℃以上の熱水で抽出し、菌体を分離後、シアニ化し、カラムクロマト、晶析などを行い得ることができる。ビタミンB<sub>12</sub>の定量は、培養菌体を集菌後、熱水抽出し、シアニオンでシアニ化後、シアノコバラミンとして高速液体クロマトグラフィーで定量できる。

【0012】以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

#### 【実施例1】

20 ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼの精製単離

プロピオニバクテリウム シャーマニーの種菌〔NOC 11 012 (FERM BP-86)〕を表1の組成の培地2.5Lを含む5L発酵槽に植菌(2%)して、pHをアルカリで6.5に連続調整し、グルコースを15g/Lの一定レベルに調節して、窒素通気の嫌気条件下で3日間攪拌培養した。

#### 【0013】

##### 【表1】

コーンステープリカー(CSL)	80g
30 グルコース	15g
バントテン酸カルシウム	10mg
ニコチン酸アミド	30mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	1.5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	45mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10mg
消泡剤 (BC-51Y)	100mg
水	1L

【0014】得られた培養液17Lを遠心分離して850gの湿菌体を得た。この湿菌体をpH6.8の50mMリン酸カリウム緩衝液3.5Lに懸濁して20分間超音波処理した。遠心分離後、上澄みを硫酸アンモニウム飽和の30%および60%の間で沈殿する蛋白を集め、pH6.8の50mMリン酸カリウム緩衝液(0.5mMジチオトレイトール(DTT), 10%エチレングリコール(EG)に溶解しゲル濾過カラムスーパーロース(Superose 12)にかけ、目的画分を該酵素活性をHPLCで測定して分画した。つぎにpH6.8の20mMビストリスプロパン(0.5mM DTT, 10% EG)に再溶解させアフィニティーカラム(Matrex Blue B)にかけて、1M NaCl含有のpH6.8の20mMビストリスプロパン(0.5mM DTT, 10% EG)で溶

5

6

離させた。さらにpH6.8 の20mMピストリスプロパン(0.5 mM DTT, 10% EG)に溶解後、陰イオン交換カラム(Mono Q)にかけ、pH6.8 の20mMピストリスプロパン(0.5mM DT T, 10% EG)に対して1MのNaClで 0%から100 %のグラジエントをかけて溶出した。この陰イオンカラムを再度\*

\*繰り返して行った。精製工程における収率、比活性を表 2に示す。

【0015】

【表2】

精製工程	蛋白質量(mg)	収率 (%)	比活性 (倍)
超音波処理	18400	100	1
硫酸分画	6808	37	1
ゲル濾過カラム	1306	7.1	20
アフィニティーカラム	136	0.74	120
陰イオンカラム	66	0.36	210
陰イオンカラム	3	0.016	1960

【0016】なお、ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼの活性測定は次のようにして行った。反応組成物として、5mM のS-アデノシルメチオニン、1mM のEDTA、1mM の還元型グルタチオン、0.5mg の還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)、1mgのATP、0.16mgのシステイン塩酸塩、25mgのジチオネイトNa塩を含む1mLの100mM リン酸カリウム緩衝液に酵素蛋白2mg を溶解し、窒素でバブリングして還元状態にした後、基質である87mMのウロポルフィリノーゲンII I 液1mL を添加して、35℃、17時間の反応を行った。ウロポルフィリノーゲンIII 液の調製は、ウロポルフィリンIII を0.025N KOH に溶解し、暗所でナトリウムアマルガムで還元した後、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> で中和することにより行った。反応後は、0.4mL の6N HCl を添加し、100℃に5分間加熱し、反応を止めた。その後、遠心分離を行いその上澄みをHPLCで分析した。HPLC条件は、C18 のODS カラムを用いて、5mM 硫酸水素テトラブチルアンモニウム / メタノール(52:48) で展開し、403nm の吸収によりウ※

※ロポルフィリノーゲンIII のモノメチル体、ジメチル体を測定した。

【0017】

【実施例2】

20 ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニングは、当該酵素のアミノ酸配列をもとにプライマーを合成し、これを用いてPCR 法により当該酵素のDNA の一部断片を増幅させた後、コロニーハイブリダイゼーション法により当該酵素遺伝子の全領域を含むDNA 断片をクローニングした。すなわち、実施例1により精製単離されたウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼのN末端配列を(株)アプライドバイオシステムズのアミノ酸シーケンサー471 A 型を用いて決定し、最初の30個のアミノ酸を以下のように決定した。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17  
Thr Thr Thr Leu Leu Pro Gly Thr Val Thr Leu Val Gly Ala Gly Pro Gly  
18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30  
Asp Pro Glu Leu Val Thr Val Ala Gly Leu Arg Ala Val

【0018】この12番目のVal から21番目のLeu にかけての10個のアミノ酸に対応するDNAを以下のように合成した。29マーで、コドンの3番目の変化に対して何種類かの候補を考慮し、全体で8種類の混合物として合成し、PCR 法用のプラスプライマーとした。

5' -GTCGGCGCCGCGCCCGGCGACCCGAGCT

A G G

【0019】マイナスプライマーとしては、当該酵素のドメイン部分と考えられアミノ酸配列の保存性が高いと思われる、N末端より92番目から98番目の次のアミノ酸配列を基に、21マーのDNA を合成した。

92 93 94 95 96 97 98

Lys Gly Gly Asp Ser Phe Val

3' -TTTCCGCCGCTGAGCAAGCAG

C C C G

【0020】次に、これらのプライマーを用いて、プロピオニバクテリウム シャーマニーの染色体DNA より当該酵素遺伝子の一部分の断片をPCR 法で増幅させたところ、約250bp の断片が増幅してきた。この断片の長さはプライマーで挟まれた約86アミノ酸残基に対応するDNA の長さであった。

【0021】この増幅された約250bp 断片をプローブとして、プラスミドpBR322のBamHI サイトにプロピオニバ

クテリウム シャーマニーの染色体DNA を制限酵素BamHI で消化した断片を挿入したライブラリーを作製し、コロニーハイブリダイゼーション法により、当該酵素遺伝子のクローン化を行った。すなわち、プロピオニバクテリウム シャーマニーの染色体DNA のpBR322によるライブラリー 1 $\mu$ g を0.1M CaCl<sub>2</sub>で30分間処理した 1 $\times 10^9$ 個のE. coli RR 1株に導入し、100 $\mu$ g/mlアンピシリン含有LB (Luria-Bertani's broth)プレートにまき、37℃で培養し、コロニーを生育させた。生育したコロニーを0.5M NaOH で変成させた後、ナイロンフィルターにコロニーのDNA を移入させた。このフィルター上のDNA と250bpのプローブとを、ベリンガーマンハイム社製、ノンラジオ核酸標識検出キット(DIG-DNA Labeling Kit)を用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、目的の遺伝子が導入されたコロニーを特定し、当該遺伝子を得た。クローン化されたBamHI-BamHI 断片は約3.5kbの長さであった。この断片上のウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子の位置をサザンハイブリダイゼーション法により特定した後、その特定された約1.2kbのBamHI-EcoRI 断片の塩基配列を決定し、当該酵素遺伝子の配列を決定した(図5)。当該酵素遺伝子は771bpであった。

【0022】

【実施例3】

ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子のプロピオニバクテリウム シャーマニー中での発現

プロピオニバクテリウムシャーマニー用のベクターpTY10024を以下のようにして調製した。複製必須領域用の部分としてプロピオニバクテリウム ペントサセウム IF012425より内在性プラスミドpTY1(図1参照)を通常のアルカリ抽出法で抽出し、そのBamHI サイトに大腸菌用のプロモータ検索用ベクターpKK232-8(Gene, 27.151(19)\*

酵母エキス	8.5g
ペプトン	8.5g
ブドウ糖	11g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g

【0027】次に、この懸濁液40 $\mu$ LにプラスミドpNOC202含有のTE(10mM Tris-HCl(pH7.5)-1mM EDTA)バッファ液 2 $\mu$ Lを混合し、氷冷したキュベットに移し、電気パルスのかけた。この条件は電圧:2.5Kv、キャパシター:25 $\mu$ F、レジスター:200 $\Omega$ であった。電気パルスのかけた後はすばやく1mLのLL培地を添加し、30℃、1時間静置後、クロラムフェニコール含有LLプレートにまいた。このプレートを7~14日間嫌気培養し、出現したコロニーを取得した。取得したコロニー(形質転換体)のウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼの活性は、実施例1の方法により測定した。その

CSL	80g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4g
グルコース	15g (コントロール)	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	45mg

\*84), 図2参照)の制限酵素BamHI 消化物を連結した。

【0023】次にマーカーとしてプラスミドpKK232-8上のクロラムフェニコール耐性遺伝子(CAT遺伝子)をプロピオニバクテリウム シャーマニーの中で発現させるためのプロモーターを、プロピオニバクテリウム シャーマニーの染色体DNA ライブラリーよりスクリーニングした。すなわち、CAT 遺伝子の上流にあるマルチクローニングサイト中のHind IIIサイトをBgl IIサイトに変えたものを用いて、そのBgl IIサイトにプロピオニバクテリウム シャーマニーの染色体DNA を制限酵素Sau3A で消化したものを連結してスクリーニングを行い、約60bpのプロモーター活性を有する断片が挿入されたプラスミドを得た(pTY10024, 図3参照)。

【0024】次に、プラスミドpTY10024マルチクローニングサイト中のSmaIサイトをEcoRVサイトに変換し、そのEcoRV サイトにウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む実施例2で得られた約1.2kbのBamHI-EcoRI 断片を挿入し、プラスミドpNOC202を作製した(図4参照)。ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現は、プラスミドpTY1部分のプロモーターからのリードスルーで行った。

【0025】得られたプラスミドpNOC202をエレクトロポレーション法(バイオラッド製、ジーンバルサー装置)によりプロピオニバクテリウム シャーマニーの菌体中に導入した。この導入は、まずプロピオニバクテリウムシャーマニーの種菌を次の表3の組成のLL培地10mLを含む試験管に植菌し、一晚静置培養した。培養プロス(OD<sub>610</sub> = 1~2)より集菌後、10%グリセロールで2回洗浄し、OD<sub>610</sub> = 2~5になるように10%グリセロールに再懸濁した。

【0026】

【表3】

トマトジュース末	3.7g
Tween 80	1.0g
水	1L
pH	6.5

結果、形質転換体の当該酵素活性は1.9 $\times 10^6$  カウント/蛋白mgで元株の0.9 $\times 10^6$  カウント/蛋白mgと比較して約2倍高くなっていた。

【0028】

【実施例4】

形質転換体のビタミンB<sub>12</sub>の生産

取得した形質転換体のビタミンB<sub>12</sub>の評価培養は、表4の組成のCSL 培地を用いて行った。

【0029】

【表4】

9

パントテン酸カルシウム 10mg  
ニコチン酸アミド 30mg

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 1.5g

【0030】2.5Lの発酵槽中CSL 培地1.2Lを入れ、CSL 培地で前培養した前培養液（フラスコ培養）から2%植 菌した。培養温度は30℃で、pHはアルカリ（2N-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+3 N-NH<sub>4</sub>OH）で6.5 に連続調整し、培養4日目までは空素通 気（1/40vvm）で攪拌し（180rpm）、DBI 添加以後は空気通 気（1/20vvm）に切り替え、攪拌速度を上げた（400rpm）。 培養7日間行った。

【0031】ビタミンB<sub>12</sub>の定量は、培養生成物である 補酵素型B<sub>12</sub>をシアン化してシアノB<sub>12</sub>としてHPLCで行 った。培養液からサンプリング後、遠心分離で上澄みを 除去し、同量のpH4.7 の酢酸緩衝液に再懸濁したのち同 量のKCN 液（1mg/L）を加え、85℃、15分間加熱抽出し た。次に遠心分離後、上澄みを採取し、蛍光灯下、2 時 間光照射し、シアン化した。シアン化液をHPLCにかけ、 シアノB<sub>12</sub>を定量した。HPLC条件は、C18 のODS カラム を用いて、pH3.7 酒石酸-リン酸緩衝液：アセトニトリ ル=88.2:11.8 の移動相で361nm で検出した。ウロポル フィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子を 導入した形質転換体の2.5L発酵槽でのビタミンB<sub>12</sub>生産 量は115mg/L となった。これに対し、元株を同様に培養 した場合のビタミンB<sub>12</sub>の生産量は88mg/Lであり、本発 明による組換え菌株を使用した場合が元株を使用した場 合よりビタミンB<sub>12</sub>の生産量が約30%増加した。

## 配列

```

ATG ACC ACC ACA CTG TTG CCC GGC ACT GTC ACC CTC GTC GGC GCC GGG 48
Met Thr Thr Thr Leu Leu Pro Gly Thr Val Thr Leu Val Gly Ala Gly
1 5 10 15
CCC GGC GAC CCT GAA CTC GTC ACC GTG GCC GGC CTG CGG GCC GTG CAG 96
Pro Gly Asp Pro Glu Leu Val Thr Val Ala Gly Leu Arg Ala Val Gln
20 25 30
CAG GCC GAG GTG ATC CTC TAC GAC CGG CTC GCC CCG CAG GAC CTG CTG 144
Gln Ala Glu Val Ile Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Pro Gln Asp Leu Leu
35 40 45
TCG GAG GCG TCC GAC GAC GCC GAA CTC GTG CCG GTC GGC AAG ATC CCG 192
Ser Glu Ala Ser Asp Asp Ala Glu Leu Val Pro Val Gly Lys Ile Pro
50 55 60
CGC GGC CAC TAT GTG CCC CAG GAG GAG ATC AAC CAA CTG CTC GTC GCG 240
Arg Gly His Tyr Val Pro Gln Glu Glu Ile Asn Gln Leu Leu Val Ala
65 70 75 80
CAC GCC CGC GAG GGC CGC AAG GTG GTG CGC CTC AAG GGT GGC GAC TCG 288
His Ala Arg Glu Gly Arg Lys Val Val Arg Leu Lys Gly Gly Asp Ser
85 90 95
TTC GTC TTC GGG CGT GGC GGC GAG GAA TGG CAG GCC TGC GCC GAG GCC 336
Phe Val Phe Gly Arg Gly Gly Glu Glu Trp Gln Ala Cys Ala Glu Ala
100 105 110
GGC ATC CCG GTG CGC GTG ATC CCG GGA GTC TCC TCG GCC ACC GCG GGC 384

```

10

BC-51Y 100mg  
5,6ジメチルベンズイミダゾール(DBI)  
20mg(4日目添加)

水 1L

【0032】本発明ではこのようにして得られる上澄み をビタミンB<sub>12</sub>として用いてもよいし、また通常の方法 で上澄みを濃縮しビタミンB<sub>12</sub>を精製単離してもよい。

## 【0033】

【発明の効果】本発明によるとプロピオン酸菌由来のウ ロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼを コードするDNA を提供することができる。また、プロピ オン酸菌で発現することができる発現シグナル、抗生物 質耐性遺伝子及びウロポルフィリノーゲンIII メチルト ランスフェラーゼをコードするDNA よりなるプラスミド を作成し、これでプロピオン酸菌を形質転換し、培養す ることによってビタミンB<sub>12</sub>を高収率に産生させること ができる。

## 【0034】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：774

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源生物名：プロピオニバクテリウムシャーマニー  
(*Propionibacterium shermanii*)

11 12  
 Gly Ile Pro Val Arg Val Ile Pro Gly Val Ser Ser Ala Thr Ala Gly  
 115 120 125  
 CCG GCG CTG GCC GGC ATC CCG CTG ACC CAT CGC CAC CTG GTG CAG GGG 432  
 Pro Ala Leu Ala Gly Ile Pro Leu Thr His Arg His Leu Val Gln Gly  
 130 135 140  
 TTC ACC GTC GTG TCG GGG CAT GTA TCG CCC AGC GAC GAG CGC TCC GAG 480  
 Phe Thr Val Val Ser Gly His Val Ser Pro Ser Asp Glu Arg Ser Glu  
 145 150 155 160  
 GTG CCA TGG CGC CAA CTC GCC AAG GAC CGG CTC ACG CTG GTG ATC CTG 528  
 Val Pro Trp Arg Gln Leu Ala Lys Asp Arg Leu Thr Leu Val Ile Leu  
 165 170 175  
 ATG GGC GTG GCC CAT ATG CGC GAC ATC GCG CCG GAA TTG ATG GCC GGC 576  
 Met Gly Val Ala His Met Arg Asp Ile Ala Pro Glu Leu Met Ala Gly  
 180 185 190  
 GGG CTG CCT GCC GAC ACC CCC GTG CGC GTG GTG AGC AAT GCG AGC CTG 624  
 Gly Leu Pro Ala Asp Thr Pro Val Arg Val Val Ser Asn Ala Ser Leu  
 195 200 205  
 GCC AGC CAG GAA TCG TGG CGC ACC ACG CTG GGC GAT GCC GTG GCC GAC 672  
 Ala Ser Gln Glu Ser Trp Arg Thr Thr Leu Gly Asp Ala Val Ala Asp  
 210 215 220  
 ATG GAC GCG CAC CAC GTG CGT CCG CCC GCG CTG GTG GTG GTG GGT ACC 720  
 Met Asp Ala His His Val Arg Pro Pro Ala Leu Val Val Val Gly Thr  
 225 230 235 240  
 CTG GCC GGC GTC GAC CTG TCG CAT CCC GAC CAT CGC GCG CCC AGC GAC 768  
 Leu Ala Gly Val Asp Leu Ser His Pro Asp His Arg Ala Pro Ser Asp  
 245 250 255  
 CAC TGA 774  
 His \*\*\*

【0035】配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：アミノ酸

\* トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：ペプチド配列

\*

Thr Thr Thr Leu Leu Pro Gly Thr Val Thr Leu Val Gly Ala Gly Pro

5

10

15

Gly Asp Pro Glu Leu Val Thr Val Ala Gly Leu Arg Ala Val

20

25

30

【0036】配列番号：3

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Gly Gly Asp Ser Phe Val

1

5

【0037】配列番号：4

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：1-29 primer bind

配列

GTCGGCGCCGGCCCCGGCGACCCCGAGCT 29

A

G

G

【0038】配列番号：5

40 配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：1-21 primer bind

配列

TTTCGCGCGCTGAGCAAGCAG 21

C

C

C

G

【図面の簡単な説明】

50 【図1】プラスミドpTY1の制限酵素地図を示す。

13

【図2】プラスミドpKK232-8を示す。図中、CAT はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、APR はアンピシリン耐性遺伝子、T はターミネーター、ori はプラスミドpBR322由来のオリジンを示す。

【図3】プラスミドpTY10024を示す。図中、P はプロモーターを示す。CAT, APR, T, oriは図1と同様の意味で用いられる。

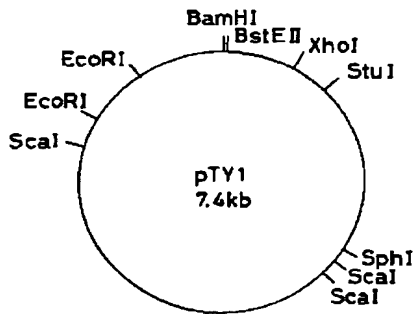
【図4】プラスミドpNOC202を示す。図中、SUMTはウロ

14

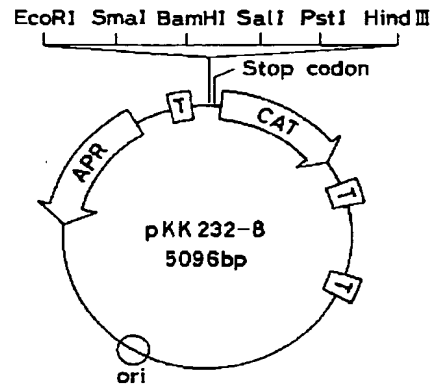
ポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子を示し、プラスミドpTY1上のP(プロモーター)の矢印はその向きを示す。CAT, APR, P, T, ori は図1及び図3と同様の意味で用いられる。

【図5】ウロポルフィリノーゲンIII メチルトランスフェラーゼ遺伝子の塩基配列とそれに対応するアミノ酸配列を示す。

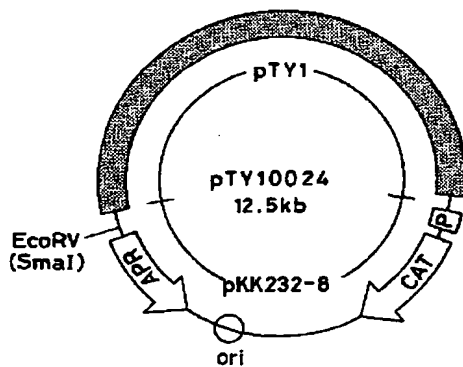
【図1】



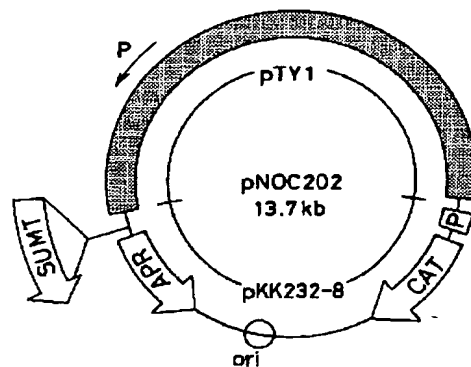
【図2】



【図3】



【図4】





【図 5】

1	ATG	ACC	ACC	ACA	CTG	TTG	CCC	GGC	ACT	GTC	ACC	CTC	GTC	GGC	GCC	GGG	48
1	Met	Thr	Thr	Thr	Leu	Leu	Pro	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	16
49	CCC	GGC	GAC	CCT	GAA	CTC	GTC	ACC	GTG	GCC	GGC	CTG	CGG	GCC	GTG	CAC	96
17	Pro	Gly	Asp	Pro	Glu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Leu	Arg	Ala	Val	Gln	32
97	CAG	GCC	GAG	GTG	ATC	CTC	TAC	GAC	CGG	CTC	GCC	CCG	CAG	GAC	CTG	CTG	144
33	Gln	Ala	Glu	Val	Ile	Leu	Tyr	Asp	Arg	Leu	Ala	Pro	Gln	Asp	Leu	Leu	48
145	TCG	GAG	GCG	TCC	GAC	GAC	GCC	GAA	CTC	GTG	CCG	GTC	GGC	AAG	ATC	CCG	192
49	Ser	Glu	Ala	Ser	Asp	Asp	Ala	Glu	Leu	Val	Pro	Val	Gly	Lys	Ile	Pro	64
193	CGC	GGC	CAC	TAT	GTG	CCC	CAG	GAG	GAG	ATC	AAC	CAA	CTG	CTC	GTC	GCG	240
65	Arg	Gly	His	Tyr	Val	Pro	Gln	Glu	Glu	Ile	Asn	Gln	Leu	Leu	Val	Ala	80
241	CAC	GCC	CGC	GAG	GGC	CGC	AAG	CTG	GTG	CGC	CTC	AAG	GGT	GGC	GAC	TCG	288
81	His	Ala	Arg	Glu	Gly	Arg	Lys	Val	Val	Arg	Leu	Lys	Gly	Gly	Asp	Ser	96
289	TTC	GTC	TTC	GGG	CGT	GGC	GGC	GAG	GAA	TGG	CAG	GCC	TGC	GCC	GAG	GCC	336
97	Phe	Val	Phe	Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Glu	Trp	Gln	Ala	Cys	Ala	Glu	Ala	112
337	GGC	ATC	CCG	GTG	CGC	GTG	ATC	CCG	GGA	GTC	TCC	TCG	GCC	ACC	GCG	GGC	384
113	Gly	Ile	Pro	Val	Arg	Val	Ile	Pro	Gly	Val	Ser	Ser	Ala	Thr	Ala	Gly	128
385	CCG	GCG	CTG	GCC	GGC	ATC	CCG	CTG	ACC	CAT	CGC	CAC	CTG	GTG	CAG	GGG	432
129	Pro	Ala	Leu	Ala	Gly	Ile	Pro	Leu	Thr	His	Arg	His	Leu	Val	Gln	Gly	144
433	TTC	ACC	GTC	GTG	TCG	GGG	CAT	GTA	TCG	CCC	AGC	GAC	GAG	CGC	TCC	GAG	480
145	Phe	Thr	Val	Val	Ser	Gly	His	Val	Ser	Pro	Ser	Asp	Glu	Arg	Ser	Glu	160
481	GTG	CCA	TGG	CGC	CAA	CTC	GCC	AAG	GAC	CGG	CTC	ACG	CTG	GTG	ATC	CTG	528
161	Val	Pro	Trp	Arg	Gln	Leu	Ala	Lys	Asp	Arg	Leu	Thr	Leu	Val	Ile	Leu	176
529	ATG	GGC	GTG	GCC	CAT	ATG	CGC	GAC	ATC	GCG	CCG	GAA	TTG	ATG	GCC	GGC	576
177	Met	Gly	Val	Ala	His	Met	Arg	Asp	Ile	Ala	Pro	Glu	Leu	Met	Ala	Gly	192
577	GGG	CTG	CCT	GCC	GAC	ACC	CCC	GTG	CGC	GTG	GTG	AGC	AAT	GCG	AGC	CTG	624
193	Gly	Leu	Pro	Ala	Asp	Thr	Pro	Val	Arg	Val	Val	Ser	Asn	Ala	Ser	Leu	208
625	GCC	AGC	CAG	GAA	TCG	TGG	CGC	ACC	ACG	CTG	GGC	GAT	GCC	GTG	GCC	GAC	672
209	Ala	Ser	Gln	Glu	Ser	Trp	Arg	Thr	Thr	Leu	Gly	Asp	Ala	Val	Ala	Asp	224
673	ATG	GAC	GCG	CAC	CAC	GTG	CGT	CCG	CCC	GCG	CTG	GTG	GTG	GTG	GGT	ACC	720
225	Met	Asp	Ala	His	His	Val	Arg	Pro	Pro	Ala	Leu	Val	Val	Val	Gly	Thr	240
721	CTG	GCC	GGC	GTC	GAC	CTG	TCG	CAT	CCC	GAC	CAT	CGC	GCG	CCC	AGC	GAC	768
241	Leu	Ala	Gly	Val	Asp	Leu	Ser	His	Pro	Asp	His	Arg	Ala	Pro	Ser	Asp	256
769	CAC	TGA															774
257	His	***															258

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

C 1 2 R 1:01)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 甘利 崇皓

神奈川県横浜市中区千鳥町 8 番地 日本石

油株式会社中央技術研究所内